

da parte dell'Autore

I NUCLEOPROTEIDI BACTERICI.

Riassunti e note

DEI

PROFESSORI ALESSANDRO LUSTIG (Firenze) E GINO GALEOTTI (Napoli).

Estratto dallo Sperimentale (Archivio di Biologia normale e patologica)

ANNO LXIII - FASC. V — SETTEMBRE-OTTOBRE 1909.

Bj 445

I NUCLEOPROTEIDI BACTERICI.

Riassunti e note

DEI

PROFESSORI ALESSANDRO LUSTIG (Firenze) E GINO GALEOTTI (Napoli).

Sommario.

- I. *Caratteri chimici dei nucleoproteidi batterici.*
- II. *Metodi di preparazione dei nucleoproteidi batterici.*
- III. *Azioni biologiche dei nucleoproteidi batterici.* — A. Azioni biologiche generali. 1. Azione coagulante; 2. Azione stimolatrice (chemiotattica positiva) sui leucociti; 3. Azione di arresto su altre cellule dotate di movimenti; 4. Azione proteolitica e distruttiva. 5. Azione pirogena. — B. Azioni biologiche specifiche dei nucleoproteidi di alcuni b. patogeni. 1. Nucleoproteide del b. della peste; 2. Nucleoproteide del vibrione del colera; 3. Nucleoproteide del *Melitensis*; 4. Nucleoproteide di un microrganismo isolato dal *Mytilus edulis*; 5. Nucleoproteide del piociano.
- IV. *Proprietà immunizzanti dei nucleoproteidi batterici.* — A. Vaccinazioni col nucleoproteide del b. della peste. 1. Primi esperimenti sugli animali; 2. Esperimenti di conferma e di confronto con altri metodi di vaccinazione; 3. Esperimenti sull'uomo; 4. Vantaggi del metodo di vaccinazione col nucleoproteide del b. della peste. — B. Vaccinazione con il nucleoproteide del vibrione colerico. — C. Vaccinazioni con il nucleoproteide del b. carbonchioso. — D. Vaccinazioni con il nucleoproteide del b. del barbone.
- V. *Anticorpi che si producono negli animali trattati con nucleoproteidi batterici.* — A. Anticorpi prodotti col nucleoproteide del b. della peste. 1. Siero battericida preventivo e curativo; 2. Nucleoproteidi degli organi di animali immunizzati con nucleoproteidi batterici; 3. Agglutinine. — B. Anticorpi prodotti mediante il nucleoproteide del vibrione colerico. — C. Anticorpi prodotti con il nucleoproteide del b. del carbonchio.

I moderni studi di chimica fisiologica, che presero origine dalle ricerche di *Hammarsten*, di *Halliburton*, di *Wooldridge*, hanno messo in evidenza, che, nella struttura di tutti i protoplasmi, entrano per gran parte quelle sostanze, ormai relativamente ben definite, che sono i nucleoproteidi. A questi corpi molto complessi si attribuiscono ora le funzioni principali ed elementari della vita. Era naturale quindi di ricercare, se anche in quei protoplasmi, che formano la

parte essenziale delle cellule batteriche, fossero contenuti nucleoproteidi, ed a questo problema preliminare noi rivolgemmo la nostra attenzione fino dal 1895.

In quel tempo era già abbastanza sviluppato lo studio della costituzione chimica dei batteri, per opera del *Cramer*, del *Nencki*, del *Brieger*, del *Hammerschlag*, del *Weyl* e soprattutto del *Buchner*: già si era riconosciuto, che il corpo dei batteri conteneva in copia sostanze proteiche, di cui alcune dotate di poteri tossici assai spiccati (proteine tossiche) e capaci anche di produrre l'immunità.

Riguardo ad una più esatta determinazione di queste sostanze proteiche ricorderemo, che dapprima esse furon confuse con la mucina (*Weyl*) e poi con le nucleoalbumine (*Gamaleya*), quando fu dimostrato, per opera di *Vandelvelde*, di *Nishimura* e di altri, che i batteri contenevano nucleine vere.

Ma spetta a noi la priorità di aver riconosciuto, che nelle cellule batteriche si trovano nucleoproteidi in gran copia, e che questi per nulla differiscono da quelli, che si possono estrarre dai tessuti degli animali superiori.

Nel 1896 uno di noi riuscì ad estrarre un nucleoproteide immunizzante dal corpo dei vibroni colerici, e, quasi contemporaneamente, incominciammo studi analoghi per riguardo alla costituzione chimica del bacillo della peste, di un bacterio simile al ranicida dell'*Ernst* e di altri microrganismi.

I.

Caratteri chimici dei nucleoproteidi batterici.

Lo studio dei caratteri chimici dei nucleoproteidi batterici fu fatto anzitutto sui nucleoproteidi ottenuti dal vibrione del colera e da un bacillo ranicida.

Identici caratteri furono poi riconosciuti anche negli altri nucleoproteidi, di cui in seguito si parlerà.

Fu sperimentato sempre con sostanze in stato di relativa purezza, ottenute dopo due o tre precipitazioni successive. Le proprietà chimiche del nucleoproteide del bacillo ranicida sono le seguenti:

È insolubile nell'acqua distillata, nell'alcool e nei solventi dei

grassi. È solubile nelle soluzioni alcaline, il liquido è allora opalino e anche leggermente mucilaginoso, se la quantità della sostanza disciolta è grande. È parzialmente solubile in soluzione di NaCl al 10 ‰. Insolubile negli acidi diluiti. Per neutralizzazione, o anche leggera acidificazione, precipita dalle soluzioni alcaline sotto forma di fiocchi bianchi. Precipita con i sali dei metalli pesanti, con cloruro di zinco, con nitrato d'argento, con l'alcool, con l'acido tannico: precipita pure per saturazione con solfato ammonico od anche con solfato magnesico. Dà la reazione del *Millon* e la reazione xantoproteica. Con idrato potassico e solfato di rame si ha un precipitato grigio verdastro (nè riduzione, nè reazione del biureto).

Se si sospendono in acqua distillata alcuni fiocchi, ottenuti per precipitazione con acido acetico, e si fa bollire il liquido, i fiocchi apparentemente non si alterano, ma se poi si alcalinizza leggermente con carbonato sodico e si sbatte bene, si vede che questi fiocchi si trasformano e si frammentano. Il liquido diventa opalino, mentre si deposita a poco a poco un precipitato formato da fiocchi piccolissimi, assai diversi dai primi. Filtrando, si ha che il filtrato precipita di nuovo per acidificazione, mentre il residuo rimasto sul filtro resta sempre insolubile e si scioglie solo negli acidi concentrati.

Si ha dunque per ebollizione una coagulazione parziale della sostanza e, per aggiunta di carbonato sodico, il distacco della parte coagulabile da un gruppo nucleinico, che resta in soluzione.

Digerendo con succo gastrico artificiale la sostanza, come essa viene estratta dai batteri, si ottiene un peptone ed un residuo insolubile, ricco di fosforo.

Facendo bollire il nucleoproteide in acido solforico diluito, si ha il distacco di corpi purinici dal gruppo nucleinico, e nel liquido si ottiene positiva tanto la reazione col nitrato d'argento ammoniacale, quanto quella col solfato di rame.

Ci occupammo anche della determinazione quantitativa del P e dell'N in questi nucleoproteidi e ottenemmo una media di 12,15 ‰ di N e di 0,028 — 0,043 ‰ di P.

Come abbiamo già accennato, queste proprietà chimiche coincidono con quelle, che caratterizzano i nucleoproteidi degli animali superiori.

II.

Metodi di preparazione dei nucleoproteidi batterici.

I varî metodi, che si usano nella preparazione dei nucleoproteidi batterici, debbono avere per base queste tre operazioni:

- 1° distruzione della membrana cellulare dei batteri,
- 2° dissolvimento dei componenti del protoplasma,
- 3° precipitazione del nucleoproteide a fine di poterlo isolare dalle altre sostanze del corpo batterico.

La sostanza ottenuta si può purificare con successivi dissolvi-
menti e precipitazioni, ma va tenuto conto del fatto, che in queste
ulteriori manipolazioni il nucleoproteide comincia a denaturarsi e
le sue proprietà chimiche e biologiche cangiano notevolmente.

Il metodo che noi abbiamo comunemente usato è questo. Si
coltivano i microrganismi su larghe superfici di terreni solidi (strati
di agar in grandi scatole di vetro, fette di patate, ecc.) e, a svi-
luppo completo, si raschia con una spatola la massa culturale, in
modo da isolarla intieramente dal terreno di coltura. Poi si aggiun-
gono a questa massa piccole quantità di soluzione di potassa al-
l'1% e si agita, finchè si ottiene un liquido denso, mucilaginoso,
trasparente. Questo viene versato in un grande vaso, contenente
due o tre litri di acqua distillata, acidulata con HCl o con acido
acetico. Agitando continuamente il liquido, si vedono allora for-
marsi larghi veli sottili e bianchi, che si frammentano in fiocchi
piuttosto grandi, i quali rapidamente si raccolgono al fondo. Si de-
canta poi il liquido e si radunano su di un filtro i suddetti fiocchi
e si lavano accuratamente con acqua distillata.

Il precipitato si scioglie poi in soluzioni di carbonato sodico
all'1% e si usa così, o si precipita di nuovo con un acido e di
nuovo si lava e si ridiscioglie in un mezzo alcalino.

Per ottenere i nucleoproteidi dei blastomiceti si può usare
anche quest'altro metodo: si macinano cioè i blastomiceti con sab-
bia di quarzo e polvere di diatomee, e poi si sottopone la pasta a
pressioni di 50-300 atmosfere. Il succo che si ottiene vien trattato

con una soluzione alcalina, e da esso si precipita il nucleoproteide mediante acidificazione.

La precipitazione del nucleoproteide si può anche ottenere, neutralizzando il liquido che lo contiene e saturandolo poi con solfato ammonico. Però in questo caso si deve dializzare per molto tempo il precipitato, a fine di togliere via ogni traccia del sale di ammonio.

Se i microrganismi, da cui si vuol estrarre il nucleoproteide, non si sviluppano bene alla superficie di terreni solidi, si possono fare colture in brodo, e, quando lo sviluppo è sufficiente, si aggiunge alla coltura quale essa è, tanta potassa in sostanza finchè il liquido ne viene a contenere l'1 %. Si agita per molto tempo e poi si precipita il nucleoproteide, acidificando. Questo metodo fu adoperato dal *De Bonis* per preparare il nucleoproteide del bacillo del barbone. Il *Del Conte* ha usato un metodo analogo per ottenere il nucleoproteide del bacillo del tifo. Egli ha trattato la coltura in brodo di questo microrganismo con alcool a 96°, fino a che precipitavano, insieme ai microrganismi, tutte le sostanze proteiche, e i loro derivati, insolubili in alcool, contenuti nel brodo. Il precipitato, lavato con alcool e acqua, era poi trattato con potassa caustica all'1 % e la soluzione veniva al solito acidificata fino a precipitazione del nucleoproteide.

Il precipitato di nucleoproteide ottenuto per acidificazione, e accuratamente lavato, può venir disseccato con grande facilità. Per questo è bene toglierlo dal filtro e distenderlo su di una lastra di vetro, che vien posta in uno dei comuni essiccatori ad acido solforico, dentro il quale è bene di far poi il vuoto. In tal modo il disseccamento completo della sostanza si compie in poco tempo, e la sostanza secca si può poi polverizzare. Si ottiene così una polvere biancastra, che si conserva indefinitamente in vasi di vetro ben chiusi, e si può poi disciogliere, in proporzioni ben definite, in soluzioni di carbonato sodico.

Ma anche senza il disseccamento, si può con facilità titolare una soluzione di nucleoproteide. A tal fine basta prendere esattamente 5 o 10 cc. di soluzione, farla evaporare in un crogiolo di porcellana fino a peso costante, bruciare accuratamente il residuo e pesare di nuovo le ceneri. La differenza fra le due pesate rappre-

senta il peso del nucleoproteide, contenuto nel campione della soluzione, però con l'errore in meno dell'anidride fosforica che fa parte del nucleoproteide, e che non si perde nell'incenerimento: questo errore si può apprezzare a circa l'1 %.

III.

Azioni biologiche dei nucleoproteidi batterici.

I nucleoproteidi batterici agiscono sulle cellule e sui tessuti degli animali superiori in modi diversi ed intensi.

Alcune proprietà biologiche di queste sostanze sono eguali a quelle, che furono descritte come caratteristiche dei nucleoproteidi di vari organi; altre sono comuni a tutti i nucleoproteidi batterici; altre infine sono specifiche e proprie di alcune specie di microrganismi patogeni.

Per riassumere i risultati ottenuti in questo ordine di ricerche, distingueremo le azioni biologiche, che qualsiasi nucleoproteide batterico è capace di esercitare, e che chiameremo *azioni biologiche generali*, dalle *azioni specifiche*.

A. Azioni biologiche generali.

Fra queste le meglio studiate sono:

- 1° l'azione coagulante,
- 2° l'azione stimolatrice (chemiotattica positiva) sui leucociti e su certi elementi linfatici,
- 3° l'azione di arresto su altre cellule dotate di movimento,
- 4° l'azione distruttiva e proteolitica che si esercita sulle cellule di molti organi parenchimali,
- 5° l'azione pirogena.

1. *Azione coagulante*. — Questa proprietà è comune anche ai nucleoproteidi, che si possono ricavare dagli organi degli animali superiori.

Se si inietta nelle vene di un coniglio o di un cane una certa quantità di soluzione di nucleoproteide, si ha in pochi minuti la morte dell'animale, e, all'autopsia, si trova il sangue coagulato nel

cuore e nei grossi vasi. Ciò fu da noi constatato in alcuni esperimenti sull'influenza del nucleoproteide del bacillo della peste sul sistema circolatorio: dagli animali in esperimento noi ottenevamo anche la curva sfigmica mediante il manometro del *Ludwig*. Potemmo allora constatare, che, in conseguenza di coagulazioni parziali, si hanno profonde alterazioni della curva della pressione sanguigna. La coagulazione non avviene sempre rapidamente (in ispecie quando la sostanza è stata iniettata nel cavo peritoneale) e uniformemente per tutto l'albero arterioso. Si formano invece a poco a poco, in diversi organi, piccoli trombi e poco per volta si chiudono alla irrigazione sanguigna limitati territori vascolari. Allora il cuore, cercando di vincere questi ostacoli mette in azione tutta la sua forza di riserva, e si vede aumentare straordinariamente l'altezza delle oscillazioni cardiache.

2. *Azione stimolatrice sui leucociti e su certi elementi linfatici.* — Quando si iniettano nucleoproteidi negli animali, si nota sempre in questi un ingorgo considerevole della milza e di tutti gli organi linfatici, poichè in questi organi si accumulano leucociti e linfociti, i quali non mostrano affatto caratteri degenerativi, ma invece sembrano eccitati a movimenti migratori, ad attività fagocitarie più intense, a fatti di moltiplicazione. Gli esperimenti diretti di chemiotassi, fatti col metodo dei tubicini di vetro o con altri metodi, per riguardo ai nucleoproteidi del bacillo della peste, del *micrococcus ureae*, della sarcina gialla, del bacillo prodigioso, del bacillo piociano e del vibrione colerico (*Menini*), confermano questa conclusione, e così pure il fatto, che vi è sempre grande accumulo di leucociti nei punti ove si sono iniettati nucleoproteidi batterici e il fatto, che gli essudati delle infiammazioni prodotte da questi nucleoproteidi si distinguono per un grandissimo contenuto di corpuscoli bianchi, ed infine il reperto di una forte leucocitosi nel sangue degli animali trattati con nucleoproteidi.

3. *Azioni d'arresto su cellule dotate di movimenti.* — Vari nucleoproteidi batterici furono sperimentati su epiteli vibratili, e su spermatozoi.

Fu sempre constatato un arresto dei movimenti attivi di queste cellule, anche prima che comparissero alterazioni morfologiche o microchimiche. È notevole questo diverso comportamento in con-

fronto con quanto abbiamo detto avvenire per i leucociti, di cui i movimenti si accelerano invece e si intensificano per opera dei nucleoproteidi.

4. *Azione necrotizzante, proteolitica e distruttiva.* — Queste azioni dei nucleoproteidi batterici sono state studiate su tessuti (pelle, cornea, fegato, rene), in contatto dei quali furono portate soluzioni di tali sostanze.

Nelle cellule del fegato si hanno alterazioni, che si possono considerare come dipendenti da una coagulazione intracellulare del protoplasma, come da una solidificazione di esso.

Nel rene invece predominano i fatti disgregativi (vacuolizzazione, disfacimento granulare) e i materiali proteici, che risultano da questa disgregazione, sono capaci, sotto l'influenza dei nucleoproteidi, di coagulare. Ne risulta allora la formazione di vera fibrina, riconoscibile, oltre che per i caratteri morfologici, anche per la reazione di *Weigert*.

I processi disgregativi vanno considerati come la conseguenza di un'azione proteolitica. Su questo argomento ritorneremo in seguito, a proposito dell'azione del nucleoproteide del bacillo della peste.

5. *Azione pirogena.* — Tutti gli animali e anche gli uomini, a cui si iniettino nucleoproteidi batterici, sia per la via intravenosa, sia per la via sottocutanea o intraperitoneale, presentano febbre, la quale generalmente compare in brevissimo tempo.

È da notarsi che bastano quantità assai piccole di nucleoproteidi (2 o 3 milligrammi per un uomo di costituzione ordinaria) per produrre innalzamenti di temperatura di uno o due gradi.

Negli esperimenti che abbiamo fatto su noi stessi abbiamo potuto constatare, che l'innalzamento della temperatura è accompagnato da tutti i sintomi più caratteristici della febbre.

B. Azioni biologiche specifiche dei nucleoproteidi di alcuni microrganismi patogeni.

1. *Nucleoproteide del bacillo della peste.* — Di questo nucleoproteide, meglio che d'altri, sono state studiate le proprietà tossiche. Anzitutto abbiamo determinato l'influenza, che esso esercita sul sistema circolatorio e abbiamo constatato:

— diminuzione della pressione arteriosa, che si verifica im-

mediatamente dopo le iniezioni endovenose e lentamente e progressivamente dopo le iniezioni intraperitoneali;

— diminuzione dell'altezza delle oscillazioni cardiache, che accompagna uniformemente l'abbassamento della pressione;

— stasi venosa generalizzata, e spesso accompagnata da emorragie.

A questi risultati sperimentali fanno riscontro le osservazioni fatte da uno di noi e da *Polverini* sui disturbi dell'apparato circolatorio nei malati di peste bubbonica.

Di più *De Bonis* e *Pietroforte* hanno studiato le alterazioni funzionali e anatomiche, riguardanti l'apparecchio respiratorio negli animali trattati col nucleoproteide del bacillo della peste ed hanno trovato, che, dopo l'iniezione di questa sostanza nelle vene o nel peritoneo dei conigli, aumenta la frequenza e la profondità degli atti respiratori, e che, dopo la morte degli animali, si trovano i polmoni alterati per stasi, iperemia e piccoli infarti.

Federici si occupò di determinare meglio l'influenza del nucleoproteide del bacillo della peste su vari organi e tessuti.

In una prima serie di esperimenti egli somministrò a topi, cavie, conigli il nucleoproteide per bocca; in altre serie inoculò detta sostanza nel tessuto sottocutaneo, nel fegato, nei reni, nei polmoni.

Risultò, che il nucleoproteide del bacillo pestigeno agisce sugli elementi cellulari degli organi e dei tessuti, producendovi alterazioni degenerative e necrotiche. Detta sostanza è capace anche di determinare fenomeni flogistici, caratterizzati da abbondante essudazione leucocitaria e di dar luogo infine ad infarti emorragici e a fenomeni trombotici.

2. *Nucleoproteide del vibrione del colera.* — Come vedremo in seguito, questo nucleoproteide, oltre che da noi, fu preparato da *Heller*, da *Schmitz* e da *Blell*.

Il primo di questi autori rivolse la sua attenzione alla tossicità di questa sostanza per le cavie e per i conigli, e prese in considerazione i fenomeni reattivi, che si manifestano dopo la inoculazione di essa. Egli constatò che l'intossicazione si verifica sollecitamente per l'impiego di dosi che variano da 10 a 15 mgr. per 100 gr. di peso dell'animale.

Anche *Menini* ottenne risultati analoghi e inoltre studiò le al-

terazioni che il nucleoproteide del vibrione colerico provoca nel connettivo sottocutaneo, nei muscoli, nel parenchima del rene e del fegato. Queste alterazioni consistono in emorragie, stravasi sanguigni, infiltrazioni leucocitarie e necrosi.

3. *Nucleoproteide del Melitensis*. — *Savagnone*, che ha preparato, con il solito metodo, questo nucleoproteide, descrive le alterazioni da esso provocate nei reni, nel fegato, nei polmoni, nel cuore, nello stomaco, nell'intestino, nel pancreas, nel sistema nervoso centrale di varî animali da esperimento e viene alla conclusione che questa sostanza si comporta in modo analogo agli altri nucleoproteidi di natura batterica, ed esercita una azione tossica e proteolitica.

I fatti istologici osservati da *Savagnone*, furono di natura degenerativa e necrobiotica, tanto a carico del citoplasma degli elementi cellulari, quanto del nucleo. Questi fatti erano costantemente accompagnati da gravi alterazioni vasali, che spiegavano l'iperemia intensa e le considerevoli e profuse emorragie che sempre accompagnavano l'avvelenamento.

4. *Nucleoproteide di un microrganismo isolato dal Mytilus edulis*. — *Zardo* studiò le proprietà tossiche di questa sostanza, inoculandola in topi, in cavie e in conigli, per via intraperitoneale, per via endovenosa e per via gastrica. In qualsiasi modo il nucleoproteide riescì assai tossico e produsse alterazioni profonde dell'apparato circolatorio e degli elementi cellulari di varî tessuti. Questa azione tossica fu diversa per intensità e per rapidità, a seconda della quantità di nucleoproteide adoperata, a seconda della via con cui esso venne introdotto nell'animale, e anche della resistenza di razza o individuale del soggetto in esperimento.

Zardo mette in rapporto questi fatti sperimentali con i fenomeni morbosi, che presentano individui ammalati per ingestione di mitili e di altri molluschi alterati od infetti.

5. *Nucleoproteide del piociano*. — *Menini* riuscì facilmente a preparare il nucleoproteide del piociano, sostanza che si mostrò assai tossica per la cavia, poichè 5 mgr. d'essa bastavano per uccidere in 24 ore una cavia di 200 gr. di peso. Iniettò questo nucleoproteide nel tessuto sottocutaneo, nei testicoli, nel rene e nel fegato di cavie e conigli e riscontrò poi in questi tessuti gravissime lesioni infiammatorie e necrotiche.

IV.

Proprietà immunizzanti dei nucleoproteidi bacterici.

Sono queste le proprietà praticamente più importanti dei nucleoproteidi, ricavati dai microrganismi. Molte ricerche nostre e di altri autori hanno ormai sicuramente dimostrato, che i nucleoproteidi sono eccellenti mezzi di vaccinazione, e che la immunità attiva, che per essi si raggiunge, è validissima e di lunga durata.

Sui vantaggi di questo metodo di vaccinazione ritorneremo tra poco: intanto accenneremo alla utilità, che proviene dall'adoperare sostanze, che indefinitamente si conservano sterili allo stato secco, che si possono ottenere pure e libere da altri prodotti tossici (tossine estracellulari), che si possono perfettamente dosare.

A. — Vaccinazioni**con il nucleoproteide del bacillo della peste.**

1. *Primi esperimenti sugli animali.* — I primi esperimenti da noi fatti durante l'anno 1897, nel laboratorio di Patologia Generale di Firenze, furono diretti a dimostrare la efficacia immunizzante del nucleoproteide del b. della peste. Essi furono eseguiti su oltre 110 fra topi delle chiaviche, ratti bianchi e topolini bianchi, su 30 conigli e su 15 cavie.

Il nucleoproteide fu iniettato, disciolto in una soluzione di carbonato sodico, talvolta sotto la pelle, talvolta nella cavità peritoneale degli animali in esperimento. Tali iniezioni in alcuni casi furono uniche, in altri invece si ripeterono 2 o 3 volte, onde rendere più stabile la immunità.

La infezione degli animali vaccinati si praticò sempre, quando questi si erano al tutto rimessi dal malessere provocato dalle iniezioni immunizzanti, e si usò ora la via peritoneale, ora la via sottocutanea; ma più spesso la prima, per ragioni che abbiamo a suo luogo esposto e che sarebbe qui troppo lungo ripetere.

Le culture adoperate furono sempre virulentissime, capaci di uccidere i ratti in 18-24 ore.

I risultati furono sempre costanti. Gli animali vaccinati resistettero sempre, anche di fronte a dosi assai grandi di coltura virulenta, mentre i controlli regolarmente morirono.

Questi esperimenti non ci lasciarono fino da allora alcun dubbio sull'efficacia del metodo di immunizzazione da noi proposto.

Nel luglio del 1897 stesso, uno di noi che si trovava a Bombay ebbe occasione di ripetere, insieme al dott. *Malenchini*, analoghi esperimenti di vaccinazione sulle scimmie. Furono adoperate le scimmie grigie, così comuni a Bombay e sufficientemente sensibili alla peste.

Togliamo da una pubblicazione nel *Centralblatt für Bakteriologie*, i periodi seguenti, in cui sono enunciati i risultati allora ottenuti.

« Dall'esame complessivo di questi esperimenti risultò, che le scimmie N. 1, 2, 3, 4, 5, 6 furono immunizzate in tre volte e ricevettero in complesso:

il N. 1	1,705	centigr.	di sostanza attiva
» » 2	1,705	»	»
» » 3	1,47	»	»
» » 4	1,41	»	»
» » 5	1,75	»	»
» » 6	1,75	»	»

« Due scimmie, N. 7 e 8, furono vaccinate in due volte e ricevettero in complesso 1,41 centigr. di sostanza attiva ciascuna.

« Due scimmie, N. 12 e 13 furono immunizzate in una volta e ricevettero ognuna 1,88 centigr. di sostanza attiva.

« In questi due ultimi esperimenti la dose iniettata in una sola volta fu troppo grande, ed ambedue le scimmie ammalarono ed una morì in breve tempo (prima dell'infezione); l'altra si riebbe lentamente, ma guarì.

« Tutte le 9 scimmie rimanenti sopportarono molto bene l'iniezione intraperitoneale o sottocutanea di discrete quantità di colture attive di peste, delle quali piccole quantità uccisero gli animali di controllo.

« Il materiale di coltura inoculato agli animali vaccinati, fu sempre molto grande, se si considera la naturale sensibilità delle

scimmie grigie. La decima parte della quantità che noi abbiamo adoperato per l'infezione sarebbe bastata per uccidere gli animali in esperimento.

« L'infezione fu fatta tre volte nella cavità peritoneale e 6 volte sotto la pelle. Abbiamo infettato gli animali inoculati in 2 casi 18 giorni dopo l'ultima vaccinazione, in un caso dopo 24 giorni, in 3 casi dopo 22 giorni e in 3 casi dopo 16 giorni.

« Da questi esperimenti risultò, in modo evidente, che la sostanza immunizzante da noi adoperata, come preventivo, contro la peste bubbonica, ha valore anche per le scimmie. Essa conferisce, dopo pochi giorni dalla sua iniezione, una immunità attiva e la sua efficacia è valevole, anche se la coltura infettante è introdotta poi negli animali in esperimento in quantità considerevoli, e se le condizioni della infezione sperimentale sono così gravi, che, senza questo trattamento preventivo, si sarebbe prodotto uno stato morboso rapidamente mortale. »

Finalmente altri consimili esperimenti di immunizzazione, mediante il nucleoproteide da noi preparato, furono ripetuti su ratti e scimmie nel Laboratorio Municipale di Parel a Bombay. Essi avevano per scopo di stabilire la durata massima dell'immunità, di determinare la dose minima di sostanza attiva necessaria, di confrontare tra loro i diversi metodi di immunizzazione, proposti per combattere la peste bubbonica.

2. *Esperimenti di conferma e di confronto con altri metodi di vaccinazione.* — Il metodo di immunizzazione contro la peste, che è stato più largamente usato, è quello di *Haffkine*, il quale si serve di colture in brodo del b. della peste, uccise mediante il riscaldamento a 60° e conservate con un antisettico. Il dott. A. Wigoura nel laboratorio municipale di Parel (Bombay), fece molti esperimenti, destinati a comparare l'efficacia dei vari metodi di immunizzazione proposti e, prima di tutto, a determinare il valore immunizzante del liquido di *Haffkine*, tal quale esso veniva usato per l'uomo. Da queste ricerche, compiute sulle scimmie, risultò:

1° Che son necessarie notevoli quantità del liquido di *Haffkine* (40-60 cmc. per una scimmia di 2 kilogr.) affinchè si produca un sufficiente grado di immunità;

- 2° che queste stato di immunità dura circa un mese;
- 3° che del liquido di *Haffkine* è soltanto attivo il deposito, formato in massima parte di corpi di bacteri, mentre il filtrato è privo di ogni potere tossico e immunizzante;
- 4° che in ogni modo il potere tossico del liquido di *Haffkine*, anche se iniettato nella sua integrità, è piccolo, giacchè se ne poterono iniettare, a scimmie di 2 kg. di peso, anche 160 cmc., senza che questi animali avessero notevolmente a soffrire.

Da altra parte, esperimenti fatti con filtrati di colture in brodo e non riscaldate, dettero risultati assai differenti.

Fu adoperato in queste ricerche circa un litro di cultura di un mese di età, fatta in brodo ordinario, contenente solo piccolissime quantità di albumosi. La coltura era assai virulenta per i ratti e per le scimmie.

Fu filtrata attraverso la candela di *Chamberland* e il filtrato, decisamente alcalino, fu diviso in due porzioni, di cui una fu usata sì come era e dall'altra si ottenne, mediante acidificazione, una sostanza identica al nucleoproteide, che si può ricavare direttamente dei bacilli della peste. Lasciato da parte questo precipitato di nucleoproteide, di cui le proprietà tossiche erano note, fu saggiato il potere tossico dei due liquidi, e cioè del filtrato originario alcalino, contenente nucleoproteide disciolto in notevole quantità, e del filtrato acido, spogliato cioè del nucleoproteide stesso. Questo filtrato fu neutralizzato prima di essere adoperato per le iniezioni.

Da questi esperimenti risultò, che le proprietà attive del liquido di *Haffkine* dipendono dal nucleoproteide che il liquido stesso, essendo alcalino, tiene, in maggiore o minor quantità, disciolto, e che proviene dallo spontaneo disfacimento parziale dei bacteri morti e degenerati.

Più tardi *Tavel*, *Krumbein* e *Gliksmann* hanno eseguito una numerosa serie di esperimenti col vaccino antipestoso di *Haffkine*, con quello della Commissione Tedesca e con quello preparato secondo il nostro metodo, e son venuti alla conclusione, che, dal punto di vista degli effetti immunizzanti, questi 3 vaccini sono da riguardarsi come dotati di uguale valore.

Relativamente alle altre proprietà del vaccino stesso, gli autori suddetti non esitano a dichiarare migliore di tutti il vaccino pre-

parato col nostro metodo, come quello che determina scarsi fenomeni di reazione, si conserva a lungo, ed è facilmente dosabile. Per queste ragioni, e per il fatto che esso si presta bene alla esportazione e come materiale di provvista per la lotta contro le epidemie di peste bubbonica, questo mezzo profilattico deve esser preferito a tutti gli altri vaccini congeneri.

3. *Esperimenti sull'uomo.* — Nel 1897, allorchè, per la prima volta, estraemmo dai bacilli della peste il nucleoproteide di cui ora si tratta, lo provammo subito su noi stessi e in altre 5 persone appartenenti al Laboratorio, iniettandolo, dopo averlo disciolto in una soluzione di carbonato sodico, sotto la pelle del braccio e in quantità variabili tra 1 e 2 milligrammi. In tutte le persone così trattate si ebbe febbre, malessere generale, mal di capo, ed una forte reazione locale (edema duro, rossore e dolore) nel punto d'iniezione. I disturbi d'indole generale cessarono dopo 24 ore, la reazione locale durò per 4 o 5 giorni, poi si dissipò senza lasciare alcuna traccia.

Nel febbraio 1898, allorchè il dott. *Polverini* ed uno di noi ci dovevamo recare di nuovo in Bombay, volemmo ripetere tali esperimenti.

Il dott. *Polverini*, che la prima volta non aveva ricevuto alcuna iniezione, subì una iniezione di 3 milligrammi di nucleoproteide disciolto nella solita soluzione alcalina. L'iniezione fu fatta di mattina e, nella giornata, il paziente cominciò a sentire brividi, mal di capo, malessere generale, disappetenza. Nella notte la temperatura salì a $38^{\circ} \frac{1}{2}$: al mattino seguente tutti questi disturbi erano già cessati e rimaneva solo una forte reazione locale, che perdurò per 3 o 4 giorni, ma che del resto non impedì affatto, che il dott. *Polverini* continuasse nelle sue occupazioni abituali. Nell'altro soggetto, già abituato in parte al nucleoproteide, la reazione locale e generale fu assai minore, e la temperatura arrivò appena a 38° .

Il *Dessy*, direttore dell'Istituto di igiene sperimentale di Buenos-Aires, nell'epidemia del 1901 a S. Nicola, usò largamente le vaccinazioni preventive ed inoculò col nucleoproteide, preparato col nostro metodo, circa 600 persone e con il vaccino di *Haffkine* circa 200. Le inoculazioni si facevano nella regione esterna del braccio.

Il *Dessy* giunge alle seguenti conclusioni: « i fenomeni di reazione locale e generale erano molto imponenti col vaccino *Lustig-Galeotti*, e quasi nulli, eccettuato in un caso, col vaccino *Haffkine*.

« Queste vaccinazioni unite alle altre misure profilattiche combatterono con efficacia l'epidemia.

« Per quanto si osservi molto l'asepsi e l'antisepsi, nel luogo della inoculazione si forma un piccolo edema che, in pochi casi, dal luogo della inoculazione scende fino al gomito. L'individuo inoculato, dopo poche ore, nota un poco di malessere e stanchezza generale sufficientemente accentuata: in qualche caso si osservò anche il vomito e la diarrea: spesso cefalea e passeggera elevazione termica, che dura generalmente poche ore ».

In epoca più recente, la preparazione del vaccino, secondo il nostro metodo, fu intrapresa a scopo industriale dall'Istituto vaccinogeno di Berna, il quale somministrò a vari paesi molte migliaia di dosi per uso di profilassi. Specialmente in Australia si adoperò questo mezzo di difesa contro la peste, e un grandissimo numero di persone furono inoculate a Perth, ad Adelaide e a Sidney. Sui risultati di questo trattamento preventivo ci sono pervenute spesso comunicazioni, per mezzo dell'Istituto di Berna, dalle quali appare che è incontrastabile l'efficacia del nostro vaccino e la sua perfetta innocuità, poichè, malgrado le intense reazioni locali o generali, mai si ebbero a notare suppurazioni o necrosi o disturbi gravi di qualsiasi specie. Risultò anche che, ripetendo le inoculazioni, l'uomo presto si abitua a questa sostanza tossica, poichè la reazione locale e generale è ogni volta meno intensa ed acuta.

Il prof. *Malenchini*, Direttore dell'Istituto d'Igiene a La Plata, ci informò ripetutamente, in questi ultimi anni, di preparare e di usare il nostro vaccino con risultati buoni sotto ogni punto di vista e di recente il *Malenchini* ha fatto una comunicazione in questo senso nel Congresso d'Igiene, che si tenne non molto tempo addietro a Santiago (Chile).

4. *Vantaggi del metodo di vaccinazione col nucleoproteide del bacillo della peste.* — I vantaggi maggiori, che si hanno col nostro metodo di vaccinazione in confronto con altri, derivano dal fatto, che la sostanza che si inocula è in uno stato di relativa purezza, è proprio la sostanza che da sola provoca i processi biochimici della immunità, ed è libera da altri elementi eterogenei, provenienti dal

terreno di coltura, i quali nulla hanno che vedere con la immunizzazione e da altra parte possono essere tossici o provocare nell'organismo altre reazioni inutili e dannose. Di più, trattandosi di una sostanza pura, basta introdurre nel soggetto da immunizzarsi quantità piccolissime di vaccino, mentre se si usano colture integrali, è necessario iniettarne quantità notevoli, il che è sempre causa di disturbi e di alterazioni.

Si deve anche notare, che, se si iniettano nei tessuti i corpi intieri dei bacilli, con lo scopo che questi corpi stessi vengano disciolti e ne vengano utilizzate le sostanze componenti per la produzione delle immunità, si procede per un cammino più lento e difficile, che non allorchè si iniettino queste stesse sostanze, già disciolte e separate, e pronte ad essere immediatamente assorbite. Si comprende subito, come in questo secondo caso la reazione dell'organismo di fronte a tali veleni bacterici, reazione in proporzione alla quale è tanto più valida l'immunità da raggiungersi, sia più rapida, più intensa e più efficace. Questo dunque è un altro vantaggio, che si ha nell'uso della sostanza immunizzante da noi preparata, di fronte all'uso delle colture di peste, iniettate così come esse sono, dopo che sono state uccise.

Un altro vantaggio è quello della facilità con cui il nucleoproteide della peste si conserva perfettamente sterile.

Le maggiori e più scrupolose precauzioni si hanno da usare soltanto per la preparazione delle colture sull'agar. Le ulteriori manipolazioni possono essere eseguite anche con una certa libertà (naturalmente vanno usati solo oggetti e liquidi perfettamente sterilizzati), giacchè, se anche può accadere che qualche bacterio venga a trovarsi in contatto con la sostanza che si va preparando, questo non ha poi modo di svilupparsi sulle sostanze disseccate e resta completamente innocuo. Si deve anche notare, che i nucleoproteidi in genere costituiscono un cattivissimo terreno di coltura per i microrganismi, e forse posseggono, almeno finchè non sono entrati in iscena fatti disgregativi, anche un certo potere bactericida. Insomma la preparazione di questa sostanza immunizzante non richiede precauzioni di asepsi più grandi di quelle, che si debbono usare nella preparazione di altre sostanze, destinate ad essere iniettate ipodermicamente, ed i pericoli d'infezione, che si hanno nelle inocula-

zioni eseguite col nostro vaccino secco e ridisciolti in liquidi sterili, non sono maggiori di quelli, che si presentano nelle somministrazioni dei comuni medicamenti per la via sottocutanea. Infatti nelle numerosissime iniezioni immunizzanti che abbiamo fatto in tanti e sì diversi animali, non abbiano mai avuto da registrare casi di infezione.

Un altro vantaggio, derivante dal fatto della conservabilità di questa sostanza allo stato secco, si ha nella facilità, con cui essa può venire distribuita e smerciata, e questo vantaggio non è trascurabile, nel caso che si debbano fare inoculazioni preventive su larghissima scala.

Finalmente una delle obiezioni più serie, che si possono rivolgere al metodo raccomandato da *Haffkine*, è che manca qualsiasi criterio di dosaggio del liquido. Le colture dei bacilli della peste si sviluppano in un modo capricciosamente irregolare: alcune razze si adattano assai male ai terreni artificiali di coltura, altre vi si sviluppano rigogliosamente, e bastano talvolta lievi variazioni nella composizione dei terreni di coltura, perchè i bacilli della peste mostrino notevoli differenze nello sviluppo e nella virulenza.

Col metodo di *Haffkine* non si può fissare alcuna dose fondamentale; non si sa quale è la minima dose necessaria per raggiungere la immunità, non si sa quale è la dose massima a cui si può arrivare, senza che i sintomi morbosi, che insorgono in seguito alla inoculazione, diventino troppo gravi. E così si ha una grande incostanza ed incertezza nei risultati: qualche volta la reazione è così forte, che si ha una vera e propria malattia, qualche volta la reazione è insignificante e non si può aver mai alcuna idea del grado di immunità, raggiunto dagli individui sottoposti alla inoculazione. E non si può neppure sperare di poter giungere, per una via indiretta qualsiasi alla determinazione, magari lontanamente approssimativa, delle dosi che si devono iniettare, giacchè nel liquido di *Haffkine*, tutti gli elementi sono incogniti ed estremamente variabili per un'infinità di cause. Fu tentato di apprezzare il potere di questo profilattico, tenendo conto della reazione locale e febbrile dei primi individui inoculati con un liquido preso come campione; ma neppure da queste osservazioni si ricavò alcun criterio di qualche valore.

E così emerge chiara la necessità di sostituire al liquido di *Haffkine* una sostanza facilmente dosabile, di cui si possano con sicurezza stabilire le dosi fondamentali, necessarie per il raggiungimento della immunità.

E tale vantaggio possiede appunto il nucleoproteide immunizzante estratto dai bacilli della peste, le dosi del quale si possono determinare assai facilmente per pesata, come quelle di qualsiasi altro medicamento, e se ne possono ottenere soluzioni perfettamente titolate.

Questa nostra opinione sulla preferenza da darsi al vaccino chimico di fronte ai vaccini culturali integrali non è isolata.

Da recenti e cortesi informazioni avute dal prof. *Tavel*, direttore dell'Istituto per le malattie infettive di Berna, ci risulta, che anche l'Ufficio Federale Svizzero di Sanità fece intraprendere *esperimenti pratici, comparativi* sui differenti vaccini contro la peste.

La Commissione incaricata di tali studi, senza preoccuparsi della parte teorica, venne alla conclusione che, mediante tutti i vaccini, qualora siano ben preparati, si può ottenere la completa immunizzazione degli animali più sensibili contro la peste, ma che il *nostro vaccino* era da preferirsi agli altri per le sue *qualità specifiche*, per la facilità di dosarlo e principalmente perchè conserva inalterate, per maggior tempo, le sue proprietà immunizzanti. La Commissione concludeva, che il nostro vaccino era il più idoneo ad essere conservato, quale materiale di riserva, per combattere l'eventuale manifestarsi di un'epidemia di peste. Secondo i suddetti sperimentatori, il vaccino, da loro preparato con il nostro metodo, ha conservato certo fino a 9 mesi (questo è il termine da loro convenuto) le sue proprietà tossiche e vaccinali inalterate. Con ciò però non è detto, che, oltre questo limite, le suddette proprietà vengano ad attenuarsi: anzi alcune altre osservazioni verrebbero a dimostrare, che il nostro vaccino si mantiene attivo per lo meno un anno e forse più.

Per concludere: coi diversi vaccini specifici e perfino con quello primitivo di *Haffkine*, si può ottenere l'immunità verso la peste. A noi pare però che nella pratica vaccinale, per le ragioni suesposte, si debba preferire agli altri il nucleoproteide, che è la vera sostanza immunizzante, non mescolata ad altri elementi eterogenei.

B. Vaccinazioni con il nucleoproteide del vibrione colerico.

I primi esperimenti di vaccinazione con il nucleoproteide dei vibrioni colerici furono fatti da uno di noi nel 1896. Le cavie, trattate con questa sostanza, resistettero alla iniezione intraperitoneale di culture assai virulente.

Assai più recentemente lo *Schmitz*, nell'Istituto vaccinogeno di Berna, ha ripreso questi esperimenti. Il nucleoproteide fu preparato nel modo già descritto (pag. 780) e mostrò un potere vaccinante efficacissimo. Gli animali da esperimento resistettero all'infezione sperimentale, anche dopo una sola iniezione immunizzante, e anche se questa aveva preceduto solo di 24 ore l'infezione. L'immunità può durare varî mesi.

Heller, nei suoi studi sulla tossicità del nucleoproteide del vibrione colerico, trovò, che, per l'impiego di dosi minori (1-5 mgr. per 100 di peso corporeo), gli animali da esperimento mostrarono lievi reazioni che, a seconda della dose impiegata, svanirono in breve tempo. Indubbiamente in questo caso ha importanza per la reazione la suscettibilità individuale. Per questa ragione *Heller* si limitò alle iniezioni di dosi più basse possibili, ma che tuttavia, come gli esperimenti dimostrarono, erano molto efficaci alla produzione di una immunità. Se gli animali sopravvivevano alla prima iniezione, essi, per la iniezione di una seconda e più elevata dose di nucleoproteide, diventavano immuni e resistevano anche, se venivano loro iniettate dosi più volte mortali di vibrioni colerigeni viventi. È da notarsi da un lato, che lo sviluppo della immunità si inizia molto presto dal momento della iniezione e sale rapidamente e d'altro lato che la immunità dura per molto tempo. Dopo 7 mesi l'azione del vaccino era ancora dimostrabile. Per ripetute iniezioni in piccole dosi si può, senza difficoltà, raggiungere la vaccinazione dell'individuo per maggior tempo.

Heller conclude, affermando, che il nucleoproteide ottenuto dai vibrioni del colera col nostro metodo, *possiede grandi vantaggi come materiale vaccinante*. Esso infatti produce in brevissimo tempo un alto grado di immunità, senza determinare una forte reazione e questa immunità è duratura. Il dosaggio del preparato si

fa facilmente e il controllo di esso negli animali da esperimento è molto esatto. Inoltre il materiale possiede il vantaggio che si può conservare in forma secca, come polvere, per molto tempo, senza che esso perda affatto del suo potere specifico, di guisa che di esso si possono conservare provviste nei paesi infestati e minacciati dal colera.

Finalmente è da accennare, che un simile materiale in forma secca, non va soggetto a nessuna alterazione nei paesi tropicali e vi può quindi essere spedito.

Blell si occupò di controllare ed ampliare le ricerche compiute dallo *Schmitz* e giunse alla conclusione definitiva, che il nucleoproteide del vibrione colerigeno, preparato con il metodo da noi descritto, produce una attiva e valida immunizzazione contro l'infezione del morbo asiatico, e che questa sostanza si presterebbe assai bene per una applicazione pratica di profilassi. Questa pratica fu effettivamente sperimentata per iniziativa dal prof. *Kolle*, ma noi ignoriamo ancora in quanti casi e con quale successo sull'uomo.

C. Vaccinazioni

con il nucleoproteide del bacillo carbonchioso.

È al *Tiberti* che spetta il merito di aver dimostrato le proprietà immunizzanti del nucleoproteide, che si può estrarre dal bacillo del carbonchio. *Casagrandi* e *Vigorita* avevano già tentato questo problema, ma erano giunti a conclusioni negative. Il *Tiberti* invece riuscì a produrre l'immunità, mostrando anche, che i risultati negativi del *Casagrandi* e del *Vigorita* erano imputabili alla difettiva tecnica adoperata. Egli modificò leggermente il nostro metodo per ovviare all'inconveniente delle spore, che resistono alla soluzione di potassa, e per produrre una più facile disintegrazione delle cellule batteriche.

A tal fine egli coltivava il bacillo alla temperatura di 42°, perchè in tal modo non si formano spore, adoperava soluzione di potassa caustica al 3 %, che lasciava agire per 3 o 4 giorni alla temperatura di 25° e di più macinava con polvere di vetro la massa colturale.

Le altre operazioni non differiscono da quelle che abbiamo

esposto a pag. 781. Col nucleoproteide così ottenuto riuscì dapprima ad immunizzare i conigli ed ottenne una valida e sicura resistenza contro la infezione. Passò poi agli esperimenti sugli ovini, e trattò due agnelli e due capretti.

I primi resistettero assai bene alle iniezioni sottocutanee o intraperitoneali di coltura virulente. I capretti morirono perchè erano molto giovani, esili e delicati.

Uno di noi confermò queste prime ricerche del *Tiberti*, riuscì a preparare il nucleoproteide del bacillo carbonchioso e ad immunizzare con esso efficacemente i conigli. Un'altra conferma di questi risultati ci è fornita dal *Rossi*, che pure produsse un'immunità specifica sui conigli, mediante iniezioni di nucleoproteide del bacillo del carbonchio.

D. Vaccinazioni

con il nucleoproteide del bacillo del barbone.

Recentemente *De Bonis* si è occupato di questo argomento e con il metodo descritto a pag. 781, ha preparato il nucleoproteide del bacillo del barbone. Egli conclude, che, trattando i conigli con questa sostanza, si produce in essi un'*immunità attiva iniziale*, capace cioè di far superare una infezione prodotta da una dose di coltura virulenta, 5-10 volte superiore alla dose minima letale. Questa immunità è prodotta anche da dosi assai piccole di nucleoproteide. I conigli, che hanno resistito alla prima inoculazione di coltura virulenta, resistono poi a dosi assai maggiori di questa, e, ripetendo le iniezioni, si possono rendere gli animali resistenti fino a dosi 100,000 volte superiori alla dose minima letale.

V.

Anticorpi che si producono negli animali trattati con nucleoproteidi batterici.

Era naturale attendersi, che i nucleoproteidi batterici, dotati di proprietà specifiche e capaci di produrre l'immunità, cagionassero negli animali con essi trattati, la formazione di anticorpi.

Noi infatti ci occupammo subito di studiare il potere antibac-

terico del siero degli animali, che erano stati immunizzati mediante ripetute iniezioni di nucleoproteidi.

**A. Anticorpi prodotti con il nucleoproteide
del bacillo della peste.**

1. *Siero bactericida preventivo e curativo.* — I primi esperimenti furono da noi fatti con il siero di conigli fortemente immunizzati e che avevano resistito a dosi mortali di coltura assai virulenta.

Provammo il siero sui topolini e sui ratti e constatammo che esso aveva proprietà preventive e curative. Riuscimmo poi ad immunizzare un cavallo e col siero di questo pure esperimentammo su varî animali e su scimmie.

Di 6 scimmie infettate e trattate col siero 5 guarirono e una sola morì.

Altri esperimenti sugli animali, col siero preparato secondo il nostro metodo, furono fatti a Bombay dal dott. *Wigoura* e da *Dessy* a Buenos Aires e i risultati non furono discordi dai nostri.

Il *Dessy* afferma, che la preparazione del siero nel cavallo riesce meglio se si inietta la soluzione del nucleoproteide per la via endovenosa, somministrando però prima all'animale forti dosi di acido citrico, a fine di prevenire la coagulazione intravascolare del sangue.

Da questi esperimenti sugli animali si passò al trattamento sieroterapico dei malati di peste. A questo proposito crediamo opportuno di riassumere nelle pagine seguenti la storia dei nostri studi di sieroterapia, eseguiti a Bombay dal 1898 al 1903. In questi studi avemmo a preziosi collaboratori i dott. *Polverini*, *Mayr* e *Choksey*.

Il primo siero fu ottenuto nell'anno 1907, da un cavallo immunizzato nel Laboratorio di Patologia di Firenze e fu provato in India su 6 malati all'Arthur Road Hospital e 5 di essi guarirono. Inoltre 29 malati furono curati col medesimo siero nell'Ospedale per la peste di Poona e 21 di essi guarirono.

Nell'anno 1898 il Consiglio Municipale di Bombay ci invitò a preparare una certa quantità di siero, che fu largamente esperimentato all'Arthur Road Hospital. Le osservazioni cliniche riguardanti gli effetti di questo siero furono raccolte coll'aiuto del dott. *Choksey*, Direttore dell'Ospedale suddetto, in modo assai completo.

Noi iniettammo il siero ad ogni ammalato di peste, senza di-

stinzione di età o di periodo di malattia, non tenendo conto delle complicazioni, alle quali talora questi malati andavano incontro.

Inoltre è degno di nota, che l'Arthur Road Hospital riceve ammalati appartenenti alle più basse classi del popolo, poveri, mal nutriti e perciò poco capaci di resistere all'infezione, la quale, in queste condizioni, appare in forma eccezionalmente grave.

I malati curati col nostro siero, fino al 10 giugno 1898, furono 175.

I risultati furono nell'insieme assai soddisfacenti, ma noi osservammo una gran differenza fra i sieri provenienti da cavalli diversi.

Numero del cavallo	Numero del salasso	Numero dei malati trattati	Morti	Guariti	Per cento di guarigioni
I	1	24	18	6	
	2	41	30	11	
	3	6	5	1	
TOTALE		71	53	18	25,35
II	1	—	—	—	
	2	13	—	—	
	3	17	—	—	
TOTALE		30	14	16	53,33
III	1	19	10	9	
	2	24	12	12	
	3	11	3	8	
TOTALE		54	25	29	53,70
IV	1	8	3	5	
	2	12	5	7	
TOTALE		20	8	12	60,00
TOTALE GENERALE		175	100	75	42,85

Così, per esempio il siero ottenuto dal cavallo segnato n. 1, nella seguente tavola, ha dato sempre i medesimi effetti, sebbene estratto ad epoche diverse ed sperimentato su diversi ammalati.

I risultati ottenuti col siero di questo cavallo non furono molto buoni e diminuirono la proporzione delle guarigioni nelle nostre statistiche.

Al contrario il siero ottenuto dal cavallo n. IV fu il più efficace in tutti i casi. (V. tabella a pag. 800).

Questi dati furono tolti dal rapporto presentato al Consiglio Municipale dal dott. *Choksey*. Di questi 175 malati curati col siero 18 si trovavano nelle condizioni più pericolose, quando essi furono sottoposti alla cura; essi ricevettero soltanto una o due iniezioni e morirono poco dopo.

Per questa ragione il dott. *Choksey* affermava nel suo rapporto, che questi 18 casi dovevano essere eliminati nella disamina definitiva del siero.

La mortalità fra i malati curati col siero deve essere perciò calcolata del 53 %, mentre la mortalità generale della peste, nello stesso periodo, periodo epidemico di eccezionale virulenza, fu, secondo le statistiche ufficiali, intorno al 94 %.

Nel 1898 furono fatti molti altri esperimenti di sieroterapia nell'uomo e i risultati di questi sono esposti in una lunga relazione del dott. *Polverini*, dalla quale togliamo ciò che segue:

« I malati furono curati negli ospedali e nella pratica privata come segue:

	Numero dei malati curati	Guarigioni	Decessi	Percentuale di guarigione
Ospedale di Arthur Road.....	403	154	249	38,21
Ospedale Marattha	28	11	17	39,28
Government House — Parel..	12	3	9	25,00
Privati	32	19	13	59,37
TOTALE.....	475	187	188	39,36

« La quota di guarigioni fu perciò del 39,36 %.

« Questi risultati appaiono di per se stessi soddisfacenti se li confrontiamo con i seguenti dati:

« Allo Spedale di Arthur Road 1190 malati furono curati senza siero durante lo stesso periodo: 233 di essi guarirono dando una percentuale del 19,57;

« Allo Spedale di Marattha 3318 malati furono curati in modo analogo, con 646 guarigioni e 19,12 di percentuale;

« Allo Spedale di Modikhana su 1384 malati si ebbero 295 guarigioni, ossia una percentuale di guarigioni di 21,31.

« È interessante il rilevare che per la intera città di Bombay si sono avuti 24752 casi di peste con 21193 morti, ossia una quota di guarigioni di 14,37 %.

« Perciò, prendendo in considerazione soltanto ciò che fu osservato negli ospedali, il confronto di questi risultati mostra, che la quota media di guarigioni nei malati non curati col siero fu del 20,06 %, mentre in quelli sottoposti al trattamento sieroterapico fu del 39,36 %, ossia che, su cento casi curati col siero, 19,30 guarirono *soltanto* in conseguenza di questo mezzo curativo, e che senza questa cura essi sarebbero fatalmente periti ».

Mentre si facevano questi esperimenti, la commissione nominata dal governo inglese per lo studio della peste in India, ci propose di seguire, per il controllo dell'efficacia reale del nostro siero il così detto trattamento alternato.

Questo metodo consisteva nel sottoporre alla cura specifica un caso di ogni due, come si presentavano nell'Ospedale di Arthur Road. Così 480 malati furono trattati col siero, mentre altri 480 servirono come *casi di controllo*.

I risultati furono: percentuale di guarigione nei casi curati col siero: 39,92 %; nei casi di controllo; 20,21 %.

Adunque, come negli esperimenti precedenti, il 19,41 % di guarigioni fu dovuto esclusivamente al siero.

Il siero preparato col nostro metodo fu confrontato negli ospedali di Bombay con il siero preparato da *Haffkine*, con quello preparato da *Yersin*, con quello dell'Istituto imperiale per le malattie infettive di Pietroburgo e infine con quello dell'Istituto *Pasteur* di Parigi.

I risultati statistici mostrarono, che il nostro siero fu il più efficace e per questo le autorità sanitarie di Bombay ne curarono la preparazione in un laboratorio, che fu a tale scopo allestito e di cui la direzione fu affidata, prima ad uno di noi, e poi al dott. *Polverini*.

2. *Nucleoproteidi degli organi di animali immunizzati col nucleoproteide del bacillo della peste.* — Il *Wigoura* nel Laboratorio municipale di Bombay a Parel eseguì una serie di ricerche, destinate a ricercare se i nucleoproteidi degli organi di animali fortemente immunizzati contro la peste avessero un potere antibatterico. Per immunizzare questi animali furono loro iniettate ripetutamente forti dosi di nucleoproteide del bacillo della peste, ricavato col nostro metodo. Come animali di prova furono usati ratti, topolini bianchi e scimmie. Da questi esperimenti risultò, che i nucleoproteidi degli organi possono acquistare, forse meglio del siero di sangue e di altre sostanze proteiche dell'organismo, una capacità immunizzante, di guisa che essi possono venire adoperati come mezzi curativi specifici.

3. *Agglutinine.* — *Franchetti* ha constatato che il siero di cavie e conigli, fortemente immunizzati contro la peste, mediante il nucleoproteide del bacillo di *Yersin*, possiede proprietà agglutinanti specifiche. Questo autore conclude perciò, che nei nucleoproteidi batterici debbono esistere quei determinati aggruppamenti chimici (sostanze agglutinogene), che sono capaci di provocare nell'organismo animale la produzione di agglutinine.

B. Anticorpi prodotti con il nucleoproteide del vibrione del colera.

Dagli esperimenti già citati dallo *Schmitz* risultò, che nel siero di sangue degli animali trattati con nucleoproteide del vibrione del colera si producono in gran copia agglutinine specifiche.

Il *Blell* ha confermato questi risultati per riguardo alle agglutinine e di più ha trovato, che questo siero esercita un notevole potere battericida *in vitro*.

**C. Anticorpi prodotti con il nucleoproteide
del bacillo del carbonchio.**

Col metodo usato da *Tiberti* si produce negli animali da esperimento (conigli) una immunità attiva così efficace, che il siero di questi animali acquista proprietà antibatteriche.

Uno di noi, come già fece il *Wigoura* per la peste, volle anche ricercare se il siero e i nucleoproteidi degli organi dei conigli immunizzati avessero proprietà preventive e curative. I risultati di questi esperimenti sono riassunti come segue.

Trattando i conigli con il nucleoproteide estratto dai bacilli del carbonchio, si produce in questi animali una immunità attiva, per cui il loro siero di sangue acquista proprietà immunizzanti considerevoli.

Anche nei tessuti si stabiliscono tali proprietà immunizzanti, in modo che da essi si possono ricavare sostanze proteiche, le quali spiegano una certa efficacia sul decorso dell'infezione carbonchiosa, sia salvando alcuni animali dalla morte, sia prolungando il decorso della malattia. Per adesso però tali sostanze sono state meno attive del siero di sangue. La loro capacità immunizzante è maggiore per il nucleoproteide estratto dai reni e per le proteine del tessuto muscolare.

La efficacia di queste sostanze immunizzanti apparve maggiore se queste sostanze erano state usate come preventivo; un po' minore, ma tuttavia abbastanza considerevole, se tali sostanze avevano agito per 24 ore a bassa temperatura sui bacilli destinati alla infezione; ancor minore nei casi in cui si iniettò contemporaneamente la coltura e la sostanza immunizzante; assai piccola se si iniettarono queste, 24 ore dopo avvenuta l'infezione. In questo ultimo caso, tanto il siero quanto i nucleoproteidi non riuscirono che a prolungare di qualche giorno la vita degli animali infettati.

D. Anticorpi prodotti col nucleoproteide del *Melitensis*.

Trambusti e *Donzello* col siero di capretto trattato con preventive inoculazioni di *Melitensis*, sono riusciti a far sopravvivere i conigli, a cui erano state iniettate dosi mortali di culture virulente.

Inoltre con la iniezione di pochi cc. di siero questi autori sono riusciti a far cessare la febbre in scimmie malate, da più di 10 giorni, con i tipici caratteri della febbre mediterranea, provocata in esse sperimentalmente con cultura virulenta di *Melitensis*.

Questi primi risultati dimostrerebbero la possibilità di ottenere un siero curativo contro questa speciale infezione, mediante il trattamento degli animali col nucleoproteide ricavato dal germe specifico di essa.

Riassunto.

1. Sono state le nostre ricerche che, per prime, hanno dimostrato la esistenza di una sostanza chimica ben definita nel corpo cellulare dei bacteri.

Questa sostanza è un nucleoproteide e i suoi caratteri chimici sono identici a tutti quelli degli altri nucleoproteidi, che si possono ricavare dai tessuti degli animali superiori.

2. Il metodo da noi seguito per preparare i nucleoproteidi bacterici, conduce all'isolamento di una sostanza, in stato di relativa purezza, che si può disseccare, conservare per molto tempo e disciogliere poi, in modo da averne soluzioni ben titolate, le quali hanno tutte le proprietà della sostanza preparata di fresco. Il nostro metodo di preparazione dei nucleoproteidi è stato impiegato con successo da molti sperimentatori.

3. Delle attività biologiche dei nucleoproteidi bacterici alcune sono eguali a quelle, che furono descritte come caratteristiche dei nucleoproteidi di vari organi: altre sono comuni a tutti i nucleoproteidi bacterici, altre infine sono specifiche e proprie di alcune specie di microrganismi patogeni.

Le attività biologiche delle due prime categorie sono:

- a) l'azione coagulante;
- b) l'azione stimolatrice (chemiotattica positiva) sui leucociti e su certi elementi linfatici;
- c) l'azione di arresto su altre cellule dotate di movimenti;
- d) l'azione distruttiva e proteolitica sulle cellule di organi parenchimali;
- e) l'azione piogena;

4. Le attività specifiche di alcuni nucleoproteidi batterici furono studiate:

- a) per il nucleoproteide del b. della peste da noi e da *Polverini*, da *De Bonis* e *Pietroforte*, da *Federici* e da altri;
- b) per il nucleoproteide del vibrione colerico da *Heller*;
- c) per il nucleoproteide del *Melitensis* da *Savagnone*;
- d) per il nucleoproteide di un microrganismo isolato dal *Mytilus edulis* da *Zardo*.
- e) per il nucleoproteide del piociano da *Menini*.

5. Abbiamo dimostrato che i nucleoproteidi batterici sono eccellenti mezzi di vaccinazione. L'immunità attiva che con essi si produce è rapida, validissima e dura per molto tempo.

Esperimenti di immunizzazione degli animali, con costante risultato positivo, furono fatti:

- a) col nucleoproteide del b. della peste, da noi, da *Malenchini*, da *Wigoura*, da *Dessy*, da *Tavel*, *Krumbein* e *Gliksmann*;
- b) col nucleoproteide del vibrione colerico, da *Galeotti*, da *Schmitz*, da *Heller*, da *Blell*, da *Schurupoff*;
- c) col nucleoproteide del b. carbonchioso da *Tiberti*, da *Galeotti*, da *Rossi*;
- d) col nucleoproteide del bacillo del barbone da *De Bonis*.

6. Il nucleodroteide del b. della peste è stato adoperato largamente per la immunizzazione degli uomini.

Questa sostanza fu dapprima provata da noi e da *Polverini* su noi stessi, a Firenze e a Bombay, e da *Dessy* a St. Nicola, da *Malenchini* per parecchi anni di seguito a La Plata. Più tardi l'Istituto Vaccinogeno di Berna ne intraprese la preparazione, per sua iniziativa, a scopo industriale e di questo vaccino furono usate molte migliaia di dosi a Perth, a Sidney, ad Adelaide e altrove.

Tutti coloro che sperimentarono questo mezzo di immunizzazione conclusero, che esso non presenta alcun inconveniente e che è un utile elemento di difesa contro le epidemie di peste.

7. Il metodo di vaccinazione con i nucleoproteidi presenta grandi vantaggi su tutti gli altri metodi, vantaggi che derivano dalla purezza della sostanza, dalla sua perfetta conservabilità e durabilità. La Commissione dell'Ufficio Federale Svizzero di Sanità, che si occupò dello studio comparativo dei vari vaccini specifici

contro la peste, concluse che il nucleoproteide preparato col nostro metodo aveva efficacissime proprietà immunizzanti e che era il più idoneo ad essere conservato, quale materiale di riserva, per combattere un'epidemia di peste.

8. I nucleoproteidi batterici provocano negli animali con essi trattati, la produzione di anticorpi specifici, che hanno poteri battericidi e agglutinanti.

a) *Wigoura* e *Galeotti* trovarono, che i nucleoproteidi d'organi d'animali trattati con nucleoproteidi batterici mostrano proprietà preventive e curative;

b) il potere preventivo, curativo e agglutinante del siero, preparato mediante il nucleoproteide del b. della peste, fu sperimentato, con soddisfacenti risultati, sugli animali e sull'uomo, da noi, da *Malenchini*, da *Polverini*, da *Franchetti*, da *Choksey*, da *Mayer* e da moltissimi medici di Bombay;

c) il potere battericida e agglutinante del siero, preparato mediante il nucleoproteide del vibrione colerico, fu constatato da *Schmitz* e da *Blell*.

d) il potere curativo del siero preparato con i nucleoproteidi del b. carbonchioso e del *Melitensis* fu sperimentato, con risultati positivi da *Galeotti* e da *Trambusti* e *Donzello*.

Durante la correktura delle bozze della presente nota, sono stati pubblicati altri lavori che confermano le nostre ricerche e che mettono ancora in evidenza i poteri tossici e immunizzanti dei nucleoproteidi batterici.

Schurupoff è riuscito ad immunizzare le cavie per mezzo di un'endotossina (nucleoproteide) ricavata trattando i vibrioni colerici con soluzione di soda al 5 %. Dopo avere iniettata questa sostanza nei cavalli ottenne da essi un siero attivissimo, che fu dapprima sperimentato con successo in varî animali infetti e fu poi provato da molti medici nelle recenti epidemie coleriche in Russia. Secondo le statistiche di *Schurupoff*, la mortalità dei colerosi trattati con questo siero è stata del 29,9 %, invece del 42 % che era la mor-

talità tra gli ammalati non sottoposti a trattamento sieroterapico. Questo autore poi conclude dicendo, che il metodo di ricavare la endotossina dei vibrioni colerici, trattando questi con soluzione di soda è il migliore di quanti adesso se ne conoscano.

Kravkoff ha estratto dai vibrioni colerici un nucleoproteide, di cui espone le proprietà fisiche e chimiche e di cui dà anche la composizione elementare. Questa sostanza è tossica per molti animali, ma specialmente per le cavie e per i conigli a dosi che oscillano tra gr. 0,1 e 0,2 per chilogrammo di animale. L'introduzione di questa tossina nelle vene o sotto la pelle o nella cavità peritoneale o nel tubo digerente, provoca gli stessi fenomeni che si osservano quando nello stesso modo si adopera una coltura colerica virulenta. Si può cioè constatare negli animali intossicati abbassamento della temperatura sino a 29°, cianosi, dispnea, diarrea e, nei cani, anche vomiti ripetuti. La rigidità post-mortale è precoce, come nei cadaveri dei colerosi. Le lesioni anatomopatologiche pure sono identiche a quelle che si osservano negli animali morti per iniezione colerica sperimentale. *Kravkoff* afferma che questo nucleoproteide è un costituente del vibrione colerico stesso, e che non si trova nei filtrati di cultura giovani, in cui i vibrioni non abbiano presentato ancora fenomeni degenerativi di disgregazione.

Bibliografia.

*Lavori eseguiti nell' Istituto di Patologia Generale di Firenze
sotto la direzione del prof. A. Lustig*

- GALEOTTI, Ricerche sulla immunizzazione delle cavie contro la peritonite colerica. (Sperimentale, a. L, f. 2, 1896).
- GALEOTTI, Beitrag zur Kenntniss der bakteriellen Nucleoproteide. (Zeitschr. f. phys. Chem., vol. XXV, f. 1-2).
- LUSTIG e GALEOTTI, Ricerche sulla vaccinazione degli animali contro la peste bubbonica. (Giornale della R. Accad. di Med. di Torino, vol. III, a. LX, f. 3-4, 1897).
- LUSTIG e GALEOTTI, Sulla possibile trasmissione per eredità o per allattamento della immunità acquisita verso la peste bubbonica. (Rend. d. R. Accad. dei Lincei, vol. VI, s. 5^a, f. 8^o, 1897).
- GALEOTTI e MALENCHINI, Experimentelle Untersuchungen bei Affen über die Schutzimpfung und die Serumtherapie gegen die Beulenpest. (Centralbl. f. Bakter., vol. XXII, n. 18-19, 1897).
- LUSTIG e GALEOTTI, Ulteriori ricerche sulla immunità degli animali contro la peste bubbonica. (Giornale della R. Accad. di Torino, vol. III, a. LX, 1897).
- LUSTIG e GALEOTTI, Versuche mit Pestschutzimpfungen bei Thieren. (Deutsche med. Wochenschr., N. 15, a. 1897).
- LUSTIG e GALEOTTI, Schutzimpfungen gegen Beulenpest. (Deutsche med. Wochenschr., n. 19, 1897).
- LUSTIG, Risultati delle ricerche fatte in India sugli animali e sull'uomo. (Pubbl. del R. Istituto di Studi prat. e di perf. di Firenze, 1897).
- LUSTIG, Risultati delle ricerche fatte in India sulla vaccinazione preventiva contro la peste bubbonica e sulla sieroterapia. (Rend. della R. Accad. dei Lincei, vol. VI, serie 5^a, fasc. 8^o, 1897).
- LUSTIG e GALEOTTI, Intorno all' azione del nucleoproteide estratto dai bacilli della peste sul sistema circolatorio. (Sperimentale, vol. LII, f. 1, 1898).

- FEDERICI, Sull' influenza che esercita la sostanza tossica, estratta dai bacilli della peste, sopra gli elementi cellulari di differenti organi. (Sperimentale, a. LII, f. 4, 1898).
- LUSTIG, Alcuni appunti sull' uso del siero contro la peste bubbonica in India. (Rivista d' Igiene e Sanità pubblica, a. X, n. 3, 1899).
- LUSTIG e GALEOTTI, Note e statistiche sul trattamento profilattico e curativo della peste bubbonica in India. (Sperimentale, a. LIV, f. 5°, 1900).
- LUSTIG, Preventive inoculations against plague. (Lancet, 15 Dec. 1900).
- ZARDO, Di un microrganismo isolato dal *Mytilus edulis*. (Sperimentale, a. LV, 1901).
- LUSTIG e GALEOTTI, The prophylactic and curative treatment of plague. (Brit. med. Journ., 26 genn. 1901).
- LUSTIG, Intorno alle vaccinazioni preventive contro la peste bubbonica. (Clinica Moderna, a. VII, n. 49, 1901).
- POLVERINI, Serumtherapie gegen Beulenpest. (Münch. med. Wochenschr, n. 15, 1903).
- TIBERTI, Ueber die immunisierende Wirkung des aus dem Milzbrandbacillus extrairten Nukleoproteïds, (Centr. f. Bakt., vol. XXXVI, 1904).
- TIBERTI, Intorno al potere immunizzante del nucleoproteide estratto dal bacillo del carbonchio ematico. (Sperimentale, a. LIX, f. 5, 1905).
- FRANCHETTI, Sul potere agglutinante del siero degli animali immunizzati col nucleoproteide del bacillo della peste. (Sperimentale, anno LXI, 1907).
- MENINI, Intorno all' azione flogistica dei prodotti bacterici esogeni nei tessuti. (Sperimentale, a. LXIII, 1909).
- Lavori eseguiti nel Laboratorio municipale di Bombay e negli Istituti di Patologia Generale di Cagliari e di Napoli, sotto la direzione del prof. Gino Galeotti.*
- GALEOTTI, Recherches sur la peste bubonique (Arch. d. Sc. biologique, vol. VII. n. 31, 1897).
- GALEOTTI e POLVERINI, Sui primi 175 casi di peste bubbonica trattati nel 1898 in Bombay. (Pubbl. d. R. Istituto di Studi Superiori pratici e di perfezionamento in Firenze, 1898).
- GALEOTTI e POLVERINI, Sui disturbi dell'apparato circolatorio nei malati di peste bubbonica. (Settimana medica dello Sperimentale, a. LII, n. 33, 1898).

- GALEOTTI, Il Laboratorio municipale di Bombay per la preparazione del siero contro la peste. (Rivista di Igiene e Sanità pubblica, a. X, n. 7, suppl., 1899).
- GALEOTTI, Sulle inoculazioni preventive contro la peste bubbonica. (Sperimentale, a. LIII, f. 3, 1899).
- RANINA, Notes on the inoculation of horses for the preparation of anti-plague serum. (The Veterinarian, Feb. 1900).
- GALEOTTI, Azione dei nucleoproteidi sulle cellule e sui tessuti. (Sperimentale, a. LIV, f. 5, 1900).
- GALEOTTI, Sul potere vaccinante dei nucleoproteidi degli organi d'animali immunizzati. (Il Morgagni, n. 3, 1903).
- DEL CONTE, Azione dei prodotti tossici bacterici sulla cicatrizzazione delle ferite. (Napoli, Jovene 1907).
- DE BONIS e PIETROFORTE, Ueber die Wirkung der toxischen Produkte der Pestbacillen auf die Atmung. (Centr. f. Bak., vol. XLVIII, f. 5, 1908).
- DE BONIS, Immunizzazione dei conigli contro il barbone dei bufali. (Giorn. intern. d. Sc. med., a. XXXI, 1909).

Pubblicazioni di altri Istituti

- CHOKSEY, Report on bubonic plague cases treated at the Arthur Road Hospital from September 24th to February 28th 1897. Bombay, 1897.
- TURKHUDD, Appendice to the Report of the Modikhana Plague Hospital. Bombay, 1899.
- POLVERINI, Report on 475 cases of plague treated in Bombay with Prof. Lustig's serum. Bombay, 1899.
- MAYR, A paper on Prof. Lustig's curative plague serum. Bombay, 1900.
- CHOKSEY, Report on the working of the Municipal Hospital for infectious diseases at Arthur Road for the year 1899. Bombay, 1900.
- MAYR, Ueber die bisherige Anwendung des Prof. Lustig'schen Pestserums in Bombay. (Wiener med. Blätter, n. 48-50, 1899).
- CHOKSEY, Some observations on plague and its treatment with Lustig's serum. (Bombay, med. a. phys. Soc., Settembre 1900).
- WILKINS, A short history of Lustig's Serum as used in Bombay. Bombay, 1901.
- TAVEL, KRUMBEIN, GLÜKSMANN, Ueber Pestschutzmassregeln. (Zeitschr. f. Hygiene, vol. XV, 1902).
- DESSY, Intorno alla preparazione del vaccino e del siero antipestoso con il metodo Lustig-Galeotti. (Il Morgagni, n. 9, 1901).

- CHOKSEY: The treatment of plague with prof. Lustig's serum. Bombay, 1903.
- JENNINGS, Papers and Statistics relating to the experiments made in Bombay with prof. Lustig's curative plague serum. Bombay, 1901.
- ROSSI, Contributo sperimentale allo studio del potere immunizzante del nucleoproteide del bacillo carbonchioso. (Gazzetta intern. di medicina, a. VII, n. 13, 1904).
- HELLER, Versuche zur Schutzimpfung gegen Cholera mit Choleranukleoproteid. (Centralb. f. Bakter., vol. XXXIX, 1905).
- SCHMITZ, Untersuchungen über das nach Lustig'schen Methode bereitete Choleravaccin. (Zeitschr. f. Hygiene, vol 52, 1906).
- BLELL, Experimentelles über Immunisierung mit Choleranukleoproteid. (Zeitschr. f. Hygiene, vol. LV, 1906).
- TRAMBUSTI e DONZELLO, Tentativi di sieroterapia nella setticemia del Bruce. (Atti della Soc. ital. di Patol., V riunione, 1908).
- SAVAGNONE, Alterazioni istologiche degli organi del coniglio per azione del nucleoproteide del Melitensis. (Atti della Soc. italiana di Patol., V riunione, 1908).
- CHOKSEY, Papers on plague, etc. (The Times Press, Bombay, 1909).
- SCHURUPOFF, Zur Frage der Gewinnung eines Heilserums gegen die Cholera. (Centrlbl. f. Bact., Vol. LXIX, Orig., pag. 623, 1909).
- SCHURUPOFF, Sur la question de l'endotoxine et de l'anti-endotoxine cholérique. (Russkij Vratsch., vol. VIII, pag. 597, 1909 e Journal de Phys. et de Pathol. gén., vol. XI, N. 4, pag. 731).
- KRAVKOFF, Sur la toxine cholérique. (Russkij Vratsch., vol. VIII, pag. 525, 1909 e Journ. de Phys. et de Pathol. gén., vol. XI, N. 4, pag. 730).



FIRENZE

SOCIETÀ TIPOGRAFICA FIORENTINA

33 - VIA S. GALLO - 33

1909